

## 学位論文要旨

### 経皮吸収型製剤開発のための評価時間を考慮した 人工高分子膜の利用に関する研究 ーポリマーナノフィルムの有効性の提示を含めてー

鈴木 貴大

皮膚の薬物透過性は一般的に乏しく、十分な治療効果が得られる経皮吸収型製剤 (Transdermal therapeutic system: TTS) を開発するためには、創薬初期において多くの新薬候補化合物から、開発可能性がある化合物をスクリーニングにより選択する必要がある。開発が難しい状況であれば、皮膚透過促進技術の利用による製剤の最適化を行う必要がある。しかしながら、これらの評価試験数は膨大であるため、試験時間の短縮、実験条件の制御性などのメリットを有する *in vitro* による皮膚透過性の予測が重要となる。なかでもポリマーから構成された人工膜 (人工高分子膜) の利用は、生体皮膚や 3 次元培養皮膚と比較して、良好なデータの再現性、使用の簡便さ、材料安定性などの観点から有効性が高いとされる。さらに評価時間を考慮すると、生体皮膚と比較して人工高分子膜は高い有効性を示すことが考えられる。24 時間以上の長時間にわたる薬物透過性評価に対する生体皮膚の利用は、性質維持の観点から推奨されていない。したがって、TTS 開発のための長時間にわたる評価系の構築には、シリコーン膜のような材料安定性に優れた人工高分子膜の利用が有効であり、新規 TTS 開発をサポートすることが考えられる。また、新規人工高分子膜であるポリマーナノフィルム (Polymer nanofilm: PNF) はナノメートルオーダーの膜厚を有するため、TTS 開発のための HTS といった短時間の薬物透過試験への有効性が期待でき、TTS 開発をサポートする人工高分子膜になることが考えられる。そこで本稿では、人工高分子膜を用いた *in vitro* 評価系を構築して、最適な評価時間が異なる 2 つの研究題目 (「薬物の過飽和状態を利用した新規 TTS 開発」、「TTS 開発のためのハイスループットスクリーニング (High-throughput screening: HTS)」) に取り組むことで、TTS 開発に対する人工高分子膜の有効性を検討した。さらに、PNF の薬物透過性の詳細を明らかにすることで、TTS 開発に対する PNF の有効性を検討した。

第 1 章では、過飽和状態を利用した新規 TTS の研究を通して、長時間にわたる薬物透過試験に対するシリコーン膜の利用可能性を検討した。さらに、過飽和状態を利用した新規 TTS に関する情報を提示するため、長時間にわたり安定な透過促進性を維持する過飽和条件を検討した。シリコーン膜を用いた評価系により、結晶化速度の遅いケトコナゾール (Ketoconazole: KCZ) と結晶成長抑制作用が強力なヒドロキシプロピルメチルセルロース (Hydroxypropyl methylcellulose: HPMC) の組み合わせは 54 時間以上、速度論的溶解度の増加を維持することが確認された。そして、24 時間確実な過飽和状態の維持と安定な皮膚透過促進が期待できる条件であることが考えられた。さらに、長時間にわたり液-液相分離濃度付近で溶解薬物濃度が維持され、ドナー側の溶解薬物濃度-時間曲線下面積が増加することは、累積透過量を増加させるのに有効であることが、シリコーン膜の利用により明らかになった。第 1 章の内容から、長時間の *in vitro* 透過試験に対してシリコーン膜は有効であり、24 時間以上の長時間にわたる薬物の透過性評価に対する利用可能性が示唆された。

第 2 章では TTS 開発のための HTS を想定した、PNF の有効性を検討した。各種人工高分子膜の薬物透過性は、*n*-オクタノール/水分配係数の対数値 ( $\log K_{ow}$ ) が -4.70~3.86 の異なる極性を有する 12 種の薬物に対して透過試験を行い評価した。人工高分子膜の Strat-M® と比較して、ポリ (L-乳酸) (Poly(L-lactic

acid): PLLA) 単独の PNF (PLLA PNF) およびポリマーアロイ化を利用した PLLA とポリ (メチルヒドロシロキサン) (Poly(methylhydrosiloxane): PMHS) の重量混合比が 1 対 1 の PNF (PLLA/PMHS (1/1) PNF) は優位に短いラグタイムを示した。そして、人工高分子膜のナノフィルム化はラグタイムの短縮に有効であることが確認された。PLLA/PMHS (1/1) PNF は  $\log K_{ow}$  が -4.70~3.86 の異なる極性を有する 12 種の薬物に対して、0.0450 時間~1.34 時間の非常に短いラグタイムを提供した。さらに、ヒト皮膚の透過性と比較して、PLLA/PMHS (1/1) PNF は 12 種類の薬物に対して非常に高い相関性を有することが確認された (ピアソン相関係数( $r$ ) = 0.929)。したがって、精度の高い皮膚透過予測が可能であることが確認された。さらに、PNF は Strat-M<sup>®</sup> では短時間の皮膚透過予測が難しい、 $\log K_{ow} > 3.00$  または  $\log K_{ow} < -2.00$  の薬物に対する HTS への利用が有効であることが考えられた。以上から、TTS 開発のための HTS に利用可能な人工高分子膜であることが明らかになった。

第 3 章では、皮膚透過促進剤適用時のニコチン透過性の変化を評価し、皮膚透過促進剤の影響を短時間で予想できる PNF を検討した。皮膚透過促進剤には、Azone、Eucalyptol、*N*-メチル-2-ピロリドン、TWEEN80 を用いた。さらに Azone に対する応答性改善のため、モノステアリン酸グリセロール (Glycerol monostearate: GMS) による脂質処理を PNF に施して、新規 PNF を調製した。PNF は Strat-M<sup>®</sup> と比較して、皮膚透過促進剤の影響を短時間で予想できることが確認された。PLLA への PMHS を利用したポリマーアロイ化は、Azone を除いた皮膚透過促進剤に対する PNF の応答性を改善させた。その要因として、ポリマーアロイ化による皮膚透過促進剤に対する拡散性と分配性の増加が考えられた。また、PLLA/PMHS (1/1) PNF への GMS による脂質処理は、Strat-M<sup>®</sup> と比較した優位に短いラグタイムを損なうことなく、Azone を含めた皮膚透過促進剤に対する PNF の応答性を改善し、PNF 内における GMS 由来のパッキング構造の形成が、応答性の改善要因であると結論付けた。なかでも PLLA/PMHS (1/1) PNF に対して 60 mg/mL GMS 溶液で脂質処理を施して調製した PNF (GMS 60 PNF) は、ヒト皮膚と比較して、皮膚透過促進剤を適用した際のニコチンに対する透過性変化の傾向が類似していた ( $r = 0.961$ )。したがって、GMS 60 PNF は皮膚透過促進剤の影響を Strat-M<sup>®</sup> よりも短時間で予測可能な PNF であることが明らかになった。

本研究結果より、シリコン膜は生体皮膚では推奨されていない 24 時間以上の長時間にわたる薬物の透過性評価に対する利用可能性が期待される。さらに、新規人工高分子膜である PNF はナノメートルオーダーの非常に薄い膜厚により、短時間の薬物透過試験に対して高い有効性が期待できると考えられる。PNF はポリマーアロイ化や脂質処理に伴う改質により、薬物透過性の制御が可能である。したがって、本研究を基礎とした今後の検討により、さらなる高機能性を発現させた PNF の調製が期待でき、TTS 開発における人工高分子膜の需要をさらに引き上げると考えられる。

## Thesis summary

### Study on utilization of artificial polymer membrane considering evaluation time for the development of transdermal therapeutic system

— Including demonstration of the efficacy of polymer nanofilm —

Takahiro Suzuki

The permeability of drugs through the skin is typically limited, thus to create a transdermal therapeutic system (TTS) with an adequate therapeutic outcome, it is crucial to screen and select the most promising drug candidates from a pool of new drug compounds during the early stages of drug discovery. In instances where development proves challenging, the formulation should be optimized using skin permeation enhancement techniques. However, due to the substantial number of these evaluation tests, it is essential to predict skin permeation *in vitro*, as it offers advantages such as a reduction in test time and control over experimental conditions. Artificial polymer membranes are known to be highly effective in terms of data reproducibility, convenience, and material stability, in comparison to both biological skin and 3D cultured skin. Additionally, artificial polymer membranes are deemed more effective than biological skin when considering the evaluation time. The use of biological skin for long-term drug permeability evaluation exceeding 24 hours is not recommended due to potential property degradation. As such, in constructing a long-term evaluation system for TTS development, it is recommended to use artificial polymer membranes with superior material stability, such as silicone membranes, to support the advancement of TTS. Furthermore, polymer nanofilms (PNF), a new type of artificial polymer membrane with a thickness of nanometer order, have the potential to be effective for short-term drug permeation tests in the context of TTS development, and may emerge as an essential artificial polymer membrane to support TTS development. In this paper, we developed an *in vitro* evaluation system using an artificial polymer membrane and worked on two research subjects with different optimal evaluation times (“novel TTS development using drug supersaturation”, “High-throughput screening (HTS) for TTS development”), and the effectiveness of the artificial polymer membrane for TTS development was investigated. Furthermore, we examined the effectiveness of PNF for development of TTS by clarifying the details of drug permeability of PNF.

In Chapter 1, we explored the feasibility of utilizing silicone membranes for extended drug permeation testing in the context of novel TTS using supersaturation. Furthermore, to provide insights on these novel TTS using supersaturation, we examined supersaturated conditions that sustain stable permeation enhancement for an extended duration. An evaluation system using silicone membrane showed that the combination of ketoconazole (KCZ), which has slow crystallization rate, and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), which has a strong crystal growth inhibitory effect, maintained a kinetic solubility increase for more than 54 hours. It was considered that these conditions could be expected to maintain a reliable supersaturated state for 24 hours and promote stable skin permeation. Furthermore, the dissolved drug concentration was maintained around the liquid-liquid phase separation concentration for an extended period, and increasing the area under the dissolved drug concentration-time curve on the donor side was considered to be effective in increasing the cumulative amount permeated. Based on the findings in Chapter 1, it was inferred that silicone membranes are efficient for extended *in vitro* permeation testing and can be

utilized for long-term drug permeation assessments lasting 24 hours or more.

In Chapter 2, we examined the effectiveness of PNF assuming HTS for TTS development. The drug permeability of various artificial polymer membranes was evaluated by conducting permeation tests for 12 drugs with different polarities with *n*-octanol/water partition coefficient ( $\log K_{ow}$ ) ranging from -4.70 to 3.86. Compared to Strat-M<sup>®</sup> of artificial polymer membrane, the PNF of poly(L-lactic acid) (PLLA) alone (PLLA PNF) and the PNF of polymer alloyed PLLA and poly(methylhydrosiloxane) (PMHS) with a weight mixing ratio of 1:1 (PLLA/PMHS (1/1) PNF) showed significantly shorter lag times. It was confirmed that nanofilm formation of the artificial polymer membrane is effective in shortening the lag time. PLLA/PMHS (1/1) PNF provided very short lag times of 0.0450 hours to 1.34 hours for 12 drugs with different polarities with  $\log K_{ow}$  of -4.70 to 3.86. In addition, it was confirmed that the PLLA/PMHS (1/1) PNF has high correlation with 12 drugs compared to the permeability of human skin (Pearson correlation coefficient ( $r$ ) = 0.929). PLLA/PMHS (1/1) PNF was confirmed that highly accurate skin permeation prediction is possible. Furthermore, PNFs were considered effective for HTS for drugs with  $\log K_{ow} > 3.00$  or  $\log K_{ow} < -2.00$ , for which short-term skin permeation prediction is difficult with Strat-M<sup>®</sup>. Based on the foregoing, it was clarified that PNFs are artificial polymer membrane that can be used for HTS of TTS development.

In Chapter 3, we assessed the changes in nicotine permeability upon the application of skin permeation enhancers and explored PNFs that can predict the effects of skin permeation enhancers within a short period of time. Skin permeation enhancers, namely Azone, Eucalyptol, *N*-methyl-2-pyrrolidone, and TWEEN80, were utilized. Moreover, to improve the responsiveness to Azone, we formulated novel PNFs via lipid treatment with glycerol monostearate (GMS). It was confirmed that PNFs can predict the effect of skin permeation enhancers in a shorter time than Strat-M<sup>®</sup>. Polymer alloying with PMHS to PLLA improved the responsiveness of PNF to skin permeation enhancers except Azone. The reason for this was thought to be the increase in diffusion and distribution of the skin permeation enhancer due to polymer alloying. Lipid treatment of PLLA/PMHS (1/1) PNF with GMS improved the responsiveness of PNFs to skin permeation enhancers, including Azone, without compromising the significantly shorter lag time compared to Strat-M<sup>®</sup>. It was concluded that the formation of GMS-derived packing structures within PNFs is a factor for improving responsiveness. PLLA/PMHS (1/1) PNF prepared by lipid treatment with 60 mg/mL GMS solution (GMS 60 PNF) showed a similar trend of change in permeability to nicotine when skin permeation enhancers were applied compared to human skin ( $r = 0.961$ ). Therefore, it became clear that GMS 60 PNF is PNF that can predict the effects of skin permeation enhancers in a shorter time than Strat-M<sup>®</sup>.

Based on the findings of this study, it is expected that silicone membranes will be valuable for conducting long-term drug permeability evaluations of 24 hours or longer, as this is not recommended with biological skin. In addition, the novel artificial polymer membrane PNF is anticipated to be highly effective for short-term drug permeation tests due to its extremely thin nanometer-scale film thickness. The drug permeability of PNF can be controlled through polymer alloying and modification via lipid treatment. Consequently, future research based on this study has the potential to generate PNFs with even greater functionality, which will further increase the demand for artificial polymer membranes in the development of TTS.

## 論文審査の結果の要旨

皮膚は外部からの物質侵入を防ぐバリアとして機能する。しかし、一部の薬物分子は皮膚を透過することができ、皮膚は薬物投与ルートにもなりうる。皮膚から投与する製剤には、局所的な作用を期待した貼付剤だけでなく、皮膚から薬物を吸収させ全身作用を狙う経皮吸収型製剤（Transdermal therapeutic system: TTS）がある。TTS の利点として、薬物血中濃度を維持できる、初回通過効果を受けない、コンプライアンスが向上することなどが挙げられ、幅広い利用が期待されている。しかし、十分な皮膚透過性を持つ薬物分子は、一般的に低分子量で親油性が高いものに限られ、TTS に利用できる薬物分子の種類は少ない。そのため、TTS 開発では薬物の皮膚透過を促進する技術が求められ、活発に研究が進められている。また、TTS 自体に関する研究だけでなく、薬物の透過性を正確に予測しうる人工高分子膜を用いた評価系についても研究例が多い。人工高分子膜は動物の摘出皮膚を代替するものとして使われ、また、摘出皮膚より再現性の高い結果が得られるなどの利点がある。鈴木 貴大氏は、TTS 開発における重要な課題である、薬物透過促進法の開発と、人工高分子膜を用いた薬物透過性評価系の構築に取り組み、本論文にて 3 章構成で論じている。

第 1 章では、「pH-shift 法による過飽和状態の形成とユーザー活性化システムを組み合わせた新規経皮吸収型製剤に関する研究」として、次の内容が記されている。薬物の透過速度を増加させるには、製剤側の薬物濃度を高くすることが有効である。しかし、通常の TTS では溶解度以上に薬物を溶解させることは不可能である。溶解度を越えて薬物が溶けた状態を過飽和状態と呼ぶ。過飽和状態は一時的なものであるが、製剤を使用する間、過飽和状態を維持できるような製剤を実現できれば、薬物透過速度の増加が見込まれる。本章の検討では、過飽和状態を作り出す手法として pH-shift 法を利用している。この手法では、pH 調整剤を含む溶液、薬物溶液を別々に用意し、これを使用直前に混合して非イオン形の薬物の割合を増加させ過飽和状態を作る。pH-shift 法を利用しフルルビプロフェン、ケトコナゾールの過飽和状態を作り、薬物透過速度を評価した。その結果、フルルビプロフェンでは過飽和状態が持続せず、薬物透過速度増加は見られなかった。一方、ケトコナゾールでは持続的な過飽和状態による薬物透過速度増加が見られた。このように薬物によって pH-shift 法の有効性が異なることについて、本文中で考察がなされている。さらに、ケトコナゾールの過飽和状態には、薬物濃厚相の生成が関与していること、ヒドロキシプロピルメチルセルロースの添加で過飽和状態がより持続すること、といった重要な知見を得ている。これら検討のなかで、人工高分子膜としてシリコン膜を用い、長時間薬物透過性を評価しうる系の構築にも成功している。さらに、pH-shift 法を使用した TTS のイメージとして、ユーザーが使用直前に pH 調整剤を含む溶液と薬物溶液を混ぜる、ユーザー活性化システムも提案している。

第 2 章では「経皮吸収型製剤開発のためのハイスループットスクリーニングに利用可能なポリマーナノフィルムに関する研究」として、以下の検討について述べられている。TTS 開発には、十分な皮膚透過性を持つ薬物分子を選定する必要があり、短時間で多くの種類の化合物を評価するハイスループットスクリーニングで使用できる人工高分子膜が求められている。これまでに、Strat-M®という人工高分子膜が皮膚透過性予測のために広く用いられているが、薬物が受容側に観測されるまでの時間（ラグタイム）が長く、透過が遅い分子では数十時間かかることもある。Strat-M®は厚みが約 300  $\mu\text{m}$  あり、その厚みが長いラグタイムの原因と考え、本章ではより薄い人工高分子膜、ポリマーナノフィルムの薬物透過実験への利用が検討されている。ポリ

マーナノフィルムは、高分子溶液をスピコーターで処理することにより得ており、高分子にはポリ(L-乳酸)、ポリ(メチルヒドロシロキサン)を用いている。得られたポリマーナノフィルムはサブミクロンの厚みを持ち、ポリ(L-乳酸)とポリ(メチルヒドロシロキサン)を混合したポリマーナノフィルムでは、Strat-M®に比べて短いラグタイムが得られた。このポリマーナノフィルムの物性評価の結果、ポリ(L-乳酸)の中にポリ(メチルヒドロシロキサン)が点在している、海島構造を形成しているなど興味深い知見も得られており、短いラグタイムとの関連性についても議論がなされている。

第3章では、「皮膚透過促進剤による皮膚の薬物透過性変化を短時間で予測可能なポリマーナノフィルムに関する研究」として、次の内容が記載されている。TTS 開発において皮膚透過性が十分でない薬物に対し、皮膚透過促進剤を添加することがある。皮膚透過促進剤としてはアルコール、界面活性剤、尿素などが用いられ、これらが皮膚構造に変化をもたらすなどの効果で、薬物の皮膚透過性が向上する。透過促進剤の効果は摘出皮膚を用いて評価されることが多いが、人工高分子膜でもその効果を評価できれば、利用価値が高い。本章ではその可能性を検討するため、第2章で有用性が示されたポリマーナノフィルムと、薬物としてニコチンを用いて各種透過促進剤の効果を評価した。その結果、ポリ(L-乳酸)とポリ(メチルヒドロシロキサン)を混合したポリマーナノフィルムにおいて、いくつかの透過促進剤でニコチンの透過速度増加が見られたものの、Azone という透過促進剤ではその効果が見られなかった。そこで Azone の皮膚透過促進性は皮膚の脂質領域での相互作用に由来していることを考慮し、ポリマーナノフィルムに脂質処理を施し、これを透過実験に用いた。ポリ(L-乳酸)とポリ(メチルヒドロシロキサン)を混合したポリマーナノフィルムに、脂質としてモノステアリン酸グリセロールの溶液を処理したものでは、Azone を含めた複数の透過促進剤によるニコチン透過促進が観察された。この結果と皮膚を用いた透過実験との比較から、脂質処理したフィルムの有用性が提示されている。フィルムの詳細な物性評価も行われ、Azone と脂質の相互作用による透過促進という機構についても、その妥当性を確認している。

以上の人工高分子膜を用いた薬物透過に関する研究は、薬剂的に重要な知見を与えるものである。pH-shift 法による過飽和状態の詳細な調査は、薬物透過性向上を目指した新たな TTS の実現につながるものである。さらにポリマーナノフィルムの有用性の提示は、今後の TTS 開発を支援すると同時に、動物実験代替法としても意義がある。さらに、複数のポリマーを混合して得られるポリマーナノフィルムの海島構造、脂質処理による物性改変などの興味深い知見は、ポリマーナノフィルムの可能性を広げ、薬学、医療分野での新たな利用につながるものと期待される。

本論文は、薬学的意義のある研究が論理的に展開され、その結果について十分な考察と議論がなされたものである。よって、本研究科課程における博士(薬学)論文に十分に値するものと判断する。